Groningen
Leyde Medical Library

DE BETEEKENIS VAN HET GLYCOLYTISCH PROCES IN SPIERWEEFSEL VOOR DE KLINISCHE SCHEIKUNDE

OPENBARE LES BIJ DE AANVAARDING ZIJNER COLLEGES ALS PRIVAAT DOCENT AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE GRONINGEN OP VRIJDAG 1 MAART 1929

DOOR

Dr. H. H. VAN DER ZOO DE JONG

M. DE WAAL — 1929 — GRONINGEN

DE BETEEKENIS VAN HET GLYCOLYTISCH PROCES IN SPIERWEEFSEL VOOR DE KLINISCHE SCHEIKUNDE

OPENBARE LES BIJ DE AANVAARDING ZIJNER COLLEGES ALS PRIVAAT DOCENT AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE GRONINGEN OP VRIJDAG 1 MAART 1929

DOOR

Dr. H. H. VAN DER ZOO DE JONG

M. DE WAAL — 1929 — GRONINGEN

DE BETEEKENIS VAN HET GLYCOLYTISCH PROCES IN SPIERWEEFSEL VOOR DE KLINISCHE SCHEIKUNDE.

Het bloed van normale personen bevat bij nuchtere maag een glucose-gehalte, dat schommelt tusschen 0,07 en 0,10 %; na voedselopname gaat dit suikergehalte in meerdere of mindere mate stijgen, terwijl het gewoonlijk niet boven 0,17 % komt. Buiten het lichaam gaat dit suikerpercentage op den duur verminderen; dit proces heeft men glycolyse genoemd. Niet alleen in bloed, doch in alle weefsels heeft in meer of mindere mate glycolyse plaats. De naam glycolyse is het eerst gebezigd door Lépine in 1890, doch hij verstaat hieronder ieder verdwijnen van suiker, zoowel door oxydatie als door splitsing, terwijl wij thans onder glycolyse alleen de splitsing onder vorming van melkzuur verstaan.

Niettegenstaande Lépine het eerst over glycolyse spreekt, mag hij toch niet beschouwd worden de ontdekker van dit proces te zijn. Reeds in 1877 zegt Claude Bernard in zijne „Leçons sur le Diabète", dat het melkzuur-produceerend ferment zich bevindt in het bloed, in de spieren en zelfs in de lever en dat hij geconstateerd heeft, dat de spieren en verschillende weefsels na den dood meer of minder zuur worden, naar de mate zij suiker of glycogeen bevatten, welke zeer snel een fermentatie ondergaan, waarbij melzuur ontstaat.

Hieruit volgt wel, dat het niet aan twijfel onderhevig is, dat hetgeen wij thans glycolyse noemen, aan Claude Bernard reeds bekend was; hetgeen echter nog niet wil zeggen, dat we alle grondleggende gedachten op dit gebied aan hem te danken hebben. In een historisch overzicht van het melkzuur-probleem zullen de namen van Berzelius en Liebig niet mogen ontbreken.

Beschouwde Lépine en vóór hem Claude Bernard reeds de glycolyse als een fermentatief proces, zoo is deze meening door anderen wel bestreden geworden. Van de bestrijders zijn

o.a. te noemen onze landgenoot Colenbrander, die zegt, dat we te maken hebben met een postmortaal verschijnsel, evenals de Franschman Arthus. Bendel en Bickel meenden, dat de suiker door de alcali van het bloed zou worden omgezet. Deze meeningen zijn echter voldoende weerlegd, evenals de opvatting, dat micro-organismen de suikeromzetting zouden bewerkstelligen door het feit, dat ook bij steriel werken en bacteriologische contrôle daarvan de glycolyse optreedt.

De strijd, of de glycolyse al of niet uitsluitend aan de levende cellen moet worden toegeschreven, werd door Blumenthal beslecht, toen hij de glycolyse in het celvrije perssap van dierlijk weefsel zag optreden.

Is het absolute bewijs hiervoor niet zoo gemakkelijk te leveren, zoo twijfelt tegenwoordig toch niemand er meer aan, dat de glycolyse als een fermentatief proces moet worden opgevat. Het feit reeds, dat het glycolytisch vermogen kan worden vernietigd, door verwarmen van het materiaal boven 50° en de vermindering der werking bij lagere temperaturen, geven aan deze opvatting grooten steun.

Na Lépine hebben zich een groot aantal onderzoekers op de bestudeering van het glycolyse-probleem toegelegd: Embden, Meyerhof, Warburg en Neuberg in het bijzonder. Hunne onderzoekingen komt groote beteekenis toe, zoowel voor de physiologie als voor de pathologie. Bij hunne onderzoekingen kreeg men hoe langer hoe meer steun aan de opvatting, dat de energie der dierlijke cel te danken is aan het glycolytisch proces. In de weefsels, waar verhoogde werkzaamheid optreedt, wordt in het algemeen eveneens de sterkste glycolyse opgemerkt. Speciaal spierweefsel vertoont sterke glycolytische werking; ook in nierweefsel heeft aanmerkelijke glycolyse plaats; in leverweefsel is zij duidelijk minder, terwijl in pancreasweefsel geen noemenswaardige glycolyse meer is te constateeren. Men neemt aan, dat de geringe glycolyse in pancreasweefsel veroorzaakt wordt door remmende factoren. Fletcher en Hopkins bewezen in 1906, dat de in werking zijnde spieren meer melkzuur produceeren dan de rustende; Meyerhof en Hill, dat het glycolytisch proces de energie levert voor de spierfunctie.

Aan eene ophooping van melkzuur in het spierweefsel wordt een rol toegeschreven bij het gevoel van vermoeidheid. De na den dood optredende melkzuurvorming is de aanleidende oorzaak van het ontstaan der lijkstijfheid. Wanneer men de omstandigheden bij spierweefsel zoodanig regelt, dat het gevormde melkzuur door diffusie kan verdwijnen, dan blijft zij achterwege. In overeenstemming hiermede zijn de in den oorlog opgedane ervaringen, dat soldaten, die bij den stormaanval gedood worden, zoo goed als dadelijk lijkstijfheid vertoonen en soms met het geweer in de hand staande blijven, in tegenstelling met hen, die in de loopgraven sterven, bij welke genoemd proces langzaam tot uiting komt. Het verband tusschen melkzuurproductie bij den groei is door Warburg gevonden, hoewel zeker reeds in 1877 vermoed door Claude Bernard, daar hij zegt, dat door hem de fermentatie onder melkzuurvorming in verschillende weefsels is geconstateerd, doch het eerst in de spieren van het foetus, en deze daar de maximale intensiteit bereikte. In overeenstemming met het feit, van den sterkeren groei, die in kanker- en ander tumorweefsel optreedt, heeft men daar eveneens verhoogde glycolytische werking aangetroffen.

Of het wezen der glycolyse in deze pathologische weefsels wel geheel op één lijn is te stellen met die in de gezonde weefsels, wordt door sommige auteurs in twijfel getrokken.

Voor een groot deel heeft de belangstelling voor de glycolyse zich geconcentreerd op het spierweefsel, voor een kleiner gedeelte op die in tumorweefsel.

Meende men oorspronkelijk, dat men bij de glycolyse met een heel eenvoudig proces te doen had, waarbij eventueel na afsplitsing van glucose deze laatste in 2 moleculen melkzuur uit elkaar viel, zoo bleek later, dat het chemisme heel wat gecompliceerder was en na de hydrolytische splitsing van glycogeen in glucose, behalve melkzuurvorming nog een synthese en een suikeroxydatie plaats vonden.

Van de producten, die intermediair bij deze omzettingen een rol spelen, heeft men er inderdaad eenige in handen gekregen. Voor een ander deel is men niet verder gekomen dan tot theoretische beschouwingen en waarschijnlijkheden. De gang van zaken bij de bestudeering der glycolyse vertoont buiten-

gewoon groote analogie met die van de alcoholische gisting. Bij deze werd oorspronkelijk eveneens gedacht, dat suiker door gist eenvoudig in alcohol en kooldioxyde werd omgezet, waarbij uit 1 molecule glucose 2 moleculen alcohol en 2 moleculen kooldioxyde zouden gevormd worden. Men vond echter later, dat het proces veel ingewikkelder was en door toevallige omstandigheden het eindresultaat ongeveer met genoemde vergelijking overeenkwam.

Euler wees er in 1913 op, dat de alcoholische gisting en glycolyse zeer nauw met elkaar verwant zijn. Virtanen bracht het bewijs bij, dat de omzetting van melksuiker door melkzuurbacillen, B. Streptococcus lactis, B. casei en andere, groote analogie met die van de hiervoor genoemde processen vertoont. Hoewel de inzichten betreffende de koolhydraatstofwisseling bij de hoogere planten in een minder ver gevorderd stadium verkeeren, staat het echter wel vast, dat in deze en meer speciaal in de zaden zich processen afspelen, die met de hier genoemde groote overeenkomst vertoonen. Vooral door de vorderingen, die de onderzoekingen van het chemisme bij de gistingsprocessen gemaakt hebben en de theorieën, die hierbij ontwikkeld zijn, heeft men een beteren kijk gekregen op de glycolyse.

Ziet men van de energieveranderingen af en richt men het oog uitsluitend op de chemische omzettingen, die bij deze processen plaats vinden, dan behoeft het geen betoog, dat deze het gemakkelijkst toegankelijk worden, indien het gelukt, ze in een homogene oplossing te doen optreden. Van het oogenblik af, waarop het aan Buchner gelukte, met behulp van een pers het ferment der alcoholische gisting, de zymase, van de levende gistcellen te scheiden, dateeren de vorderingen der inzichten bij dit proces gemaakt n.l. de ontdekking van het coferment, het hexosephosphorzuur, de carboxylase en nog andere dingen meer. Embden verkreeg in 1914 een perssap uit zoogdierenweefsel, dat een spontane melkzuurvorming vertoonde. Er ontstond daaruit bij 40° C. een hoeveelheid melkzuur, die 0,1 tot 0,2 % bedroeg, berekend naar het persvolumen. De melkzuuropbrengst kon hij nog doen stijgen door toevoeging van hexose-di-phosphorzuur, terwijl toevoeging van glycogeen en druivensuiker geen invloed op de

melkzuurproductie uitoefende. De constateering van deze feiten gaf den doorslag voor Embden's veronderstelling, dat hexose-di-phosphorzuur als een tusschenproduct bij de melkzuurvorming zou optreden.

Verloopt de melkzuur-afsplitsing in spierbrij zoowel als in het extract onder normale omstandigheden spontaan, doordat de chemische omzettingen onmiddellijk in elkaar grijpen, zoo leent een dergelijk extract zich bij uitnemendheid om door bepaalde factoren uit te schakelen en zoo noodig andere te versterken, de chemische omzettingen in étappes te doen verloopen.

Door Meyerhof is de bestudeering der glycolyse in waterige extracten in 1926 op nauwkeurige wijze ter hand genomen. Hij ging daarbij uit, zoowel van spierweefsel van koudbloedige- (kikkers) als van warmbloedige dieren (konijnen). Hij verkreeg hieruit extracten met een hoog gehalte aan melkzuur-splitsend ferment, welke bovendien practisch gesproken koolhydraatvrij waren. Bij de bereiding wordt het spierweefsel niet van tevoren fijn geknipt of gemalen, doch als zoodanig in licht bevroren toestand (— 1 tot — 2° C.) in water of in kaliumchloride-oplossing uitgedrukt en de aldus verkregen vloeistof scherp gecentrifugeerd; daarna wordt de heldere of opalescceerende vloeistof afgeschonken. Kikkerextracten zijn zeer slecht te bewaren. Bij kamertemperatuur zijn ze na eenige uren reeds niet meer bruikbaar; in een koudmakend mengsel bij —3° C. blijven ze een halven dag goed. Konijnenextracten kunnen door bewaring in ijs na 24 uur nog voor proeven aangewend worden. De sterkte loopt gedurende het bewaren wel terug.

Beter houdbare extracten zijn in poedervorm te verkrijgen. De waterige extracten worden dan in de 14-voudige hoeveelheid met ijs gekoelde aceton gegoten, het gevormde neerslag wordt met aether uitgewasschen en boven zwavelzuur gedroogd. Fermentpoeder, afkomstig van kikkers, is minder houdbaar en niet zoo werkzaam als van konijnen (het poeder van deze laatsten blijft eenige weken goed). De werkzaamheid van het poeder kan tot 40 % bedragen, berekend naar de hoeveelheid extract, waarvan wordt uitgegaan. Vergelijkt men de werking van gelijke gewichtshoeveelheden versch spier-

weefsel en droog ferment, dan produceert het poeder vijf maal zooveel melkzuur.

De al of niet aanwezigheid van zuurstof heeft op het beloop der door een extract veroorzaakte glycolyse geen invloed, daar deze geen zuurstof verbruikt. Met spierbrij daarentegen is er wel verschil, omdat de ademhaling der cellen doorgaat en deze omstandigheid remmend werkt op de glycolyse. De invloed hiervan wordt uitgedrukt in een door Meyerhof aangegeven factor. Deze wordt berekend door het verschil der anaërobe- en aërobe-glycolyse te deelen door de ademhaling. Hij bedraagt voor spierweefsel 1 à 2.

De glycolyse verloopt in hoofdzaak in drie étappes:

1°. Vorming van glucose uit glycogeen.

2°. Verestering van glucose door phosphorzuur.

3°. Afsplitsing van melkzuur.

In het eerste stadium van het proces hebben we te doen met de diastatische splitsing van glycogeen in glucose en de verestering daarvan met phosphorzuur, zooals deze eveneens bij de alcoholische suikergisting tot uiting komt. Harden en Young hebben aangetoond, dat perssap, verkregen uit gist, het vermogen om suiker te vergisten bij voortgezette dialyse of door ultrafiltratie, verliest. Dit vermogen keert terug, indien men het ultrafiltraat of het dialysaat, van tevoren tot een kleiner volumen teruggebracht, opnieuw aan het residu toevoegt. Hetzelfde succes bereikt men eveneens door inplaats daarvan gekookt perssap toe te voegen. Voor het optreden van het proces is een samengaan van het thermolabiele ferment, de zymase, met een relatief thermostabielen factor, het coferment, cozymase genoemd, noodzakelijk, terwijl deze laatste door dialyse of ultrafiltratie van het ferment is te scheiden. Meyerhof heeft het eerst deze combinatie in spierweefsel gevonden en aangetoond, dat ze daar noodzakelijk was voor het optreden der glycolyse. Het coferment trof hij verder in alle dierlijke weefsels aan, welke door hem daarop werden onderzocht, hetgeen hem aanleiding gaf, het vermoeden uit te spreken, dat het coferment wel in alle weefsels zal voorkomen.

Hoewel het mogelijk zou kunnen zijn, dat de beide principes diastase en cozymase bij de gist verschillen van die bij spier-

weefsel, is dit toch nimmer een punt van ernstig meeningsverschil geweest. Ze kunnen onderling verwisseld worden en kleine afwijkingen kunnen verklaard worden door het verschillend milieu, waarin zij worden aangetroffen. Motieven voor deze veronderstelling zijn er dus niet. Evenals bij de gistingsprocessen heeft bij de glycolyse de toevoeging van een gepaste hoeveelheid anorganisch phosphaat een gunstigen invloed op het beloop van het proces. Uit den aard der zaak moet toch een voldoende hoeveelheid anorganisch phosphaat aanwezig zijn, om de vorming van hexose-phosphorzuur tot stand te doen komen. Bij de alcoholische gisting kan zich bovendien nog een moment voordoen, waarbij het proces niet op gang kan komen en door toevoeging van slechts een minimale hoeveelheid hexose-di-phosphorzuur dadelijk intensief gaat verloopen. Dit verschijnsel wordt inductie genoemd.

Om uit te maken, dat het coferment volledig is gescheiden van het ferment, heeft Meyerhof aangegeven, dat het niet meer mogelijk mag zijn, het proces weer op gang te brengen door toevoeging van phosphaat en hexose-di-phosphorzuur.

Het coferment is gedurende korten tijd tegen koken bestand. Vermoed wordt, dat het coferment van de zymase eveneens als zoodanig fungeert t.o.v. het ferment, dat de ademhaling bewerkstelligt.

Tastte men tot dusverre over de geheimzinnige natuur en de functie van het coferment in het duister, zoo hebben de onderzoekingen van onze landgenooten Kluyver en Struyck een groot deel van dezen sluier opgelicht. Hun komt de verdienste toe, de reeds bekende bevindingen over het coferment bij de alcoholische suikergisting, die voor een groot deel langs elkaar heen gingen, met elkaar in verband gebracht te hebben en door completeering met hunne onderzoekingen meer licht daarover te hebben doen schijnen.

Buchner en zijne medewerkers constateerden reeds omstreeks 1900, dat zoodra de zymase uit de levende cel is geïsoleerd, zij aan de vernietigende werking van een eiwitsplitsend ferment, endotryptase genaamd, is blootgesteld. Aan den anderen kant vonden zij, dat toevoeging van kooksap remmend werkte op dezen schadelijken invloed. Buchner noemde dit werkzame principe antiprotease. Zij vonden, dat door

koken van zoo'n perssap gedurende 7 uren wel de werking van het coenzym was verdwenen, doch niet van de antiprotease. Merkwaardig is het, dat groote mannen op dit gebied, zooals Meyerhof en Euler, nimmer van deze bevindingen notitie hebben genomen en geen verband hebben gezocht tusschen coferment en antiprotease. Kluyver en Struyck kregen na kennis genomen te hebben van de genoemde publicaties de opvatting, dat wellicht een willekeurige antiproteolytisch werkende stof in staat zou kunnen zijn, het coferment Meyerhof te vervangen. Om het bewijs daarvan te kunnen leveren, moest wel in de eerste plaats vast komen te staan, dat een antiproteolytisch werkende substantie werd toegevoegd, die onverdacht vrij was van coferment Meyerhof. Zij verwijderden daarom uit een gistsap het coferment en stelden vast door contrôle volgens Meyerhof, dat het inderdaad niet meer kon aangetoond worden. Een gedeelte daarvan werd met een phosphaatoplossing even opgekookt en vervolgens aan het andere, niet gekookte gedeelte opnieuw toegevoegd. Het resultaat was, dat de zymase geregenereerd werd en de gisting weer inzette. Door hunne onderzoekingen konden zij het tevens waarschijnlijk maken, dat de factor door Buchner als coferment betiteld, identiek was met hexose-di-phosphaat. Bij de celvrije gisting is dus een factor noodzakelijk, waaraan de functie toegekend moet worden, de zymase te beschutten tegen den vernietigenden eiwit-splitsenden invloed van de endotryptase. Het begrip cozymase is dus verschoven naar een ander n.l. de antiprotease. Zij stellen daarom voor het woord cozymase voortaan maar uit de litteratuur te schrappen.

Na de uiteenzetting van deze factoren, die al dadelijk een rol spelen bij de glycolyse, zullen we het proces thans in étappes gaan vervolgen.

Reeds aan Euler en Myrbäck was het gelukt om in spierbrij van konijnen en kikkers een hydrolyse van glycogeen in suiker te bewerkstelligen, wanneer zij de P_H door toevoeging van phosphaatoplossing op 6.5 brachten. De verdere omzetting tot melkzuur was dan geremd. Lohmann verkreeg nog betere resultaten met de zoo even genoemde spierextracten. Deze werden van tevoren gedurende 15 minuten op 37° C. verwarmd; reeds hierdoor was het vermogen om uit glycogeen

melkzuur af te scheiden opgeheven en ontstond alleen suiker. Na deze behandeling had hij dus uitsluitend te maken met de diastatische werking van het extract, terwijl de glycolytische invloed niet kon ingrijpen. Het gelukte L o h m a n n niet, directe tusschenproducten te isoleeren. De splitsing van glycogeen verliep, zooals reeds de wanverhouding tusschen de draaiing en reductie deed vermoeden, niet kwantitatief tot glucose, doch bleef voor een deel op tusschenproducten staan. Deze konden zelfs niet meer door gist of door het niet vóórverwarmde extract gesplitst worden. Met behulp van dialyse door collodium-membranen kreeg hij een dezer producten in handen. Door de analyse daarvan was hij in staat uit te maken, dat hij vermoedelijk met een trisaccharide te doen had, identiek met amylotriose, een lichaam, dat door P r i n g s h e i m met behulp van zoutzuur eveneens uit glycogeen is verkregen. Waarschijnlijk is dit amylotriose op te vatten als een stabiliseeringsproduct van een ander, dat wel als tusschentrap een rol zal spelen.

De moeilijkheid bij de bestudeering van dit gedeelte van het proces is wel daarin gelegen, dat men over de moleculaire structuur van het glycogeen en van de polysacchariden in het algemeen, niet georiënteerd is. P r i n g s h e i m verkreeg langs chemischen weg uit glycogeen trihexosaan en hij denkt, dat dit lichaam daaruit zonder tusschentrappen ontstaat. L o h m a n n ontdekte bij zijne onderzoekingen wel merkwaardige reactieverschillen bij de omzettingen der hoogere suikers, naargelang hij met een uitsluitend diastatischwerkend extract experimenteerde dan wel met een, dat tevens melkzuur afscheidde. Werden door het laatstgenoemde extract glycogeen, zetmeel, amylumpectine, amylose en trihexosaan vlot in melkzuur omgezet, zoo bleek daarentegen, dat met het uitsluitend diastatischwerkende extract, alleen glycogeen en trihexosaan even sterk gehydrolyseerd worden en de overige genoemde stoffen slechts in geringe mate. In verband met een en ander is dus wel eene aanwijzing verkregen, dat wellicht trihexosaan als tusschenproduct zal optreden, terwijl het door L o h m a n n gevonden amylotriose het stabiliseeringsproduct daarvan zou kunnen zijn. Nog op een andere merkwaardigheid valt in dit verband te wijzen. Door L a q u e r was reeds opgemerkt, dat glycogeen

door spierweefsel sneller in melkzuur wordt omgezet dan glucose. Bij 45° C. verloopt alleen nog maar de glycogeen-omzetting en wordt uit glucose geen melkzuur meer gevormd. Door bevriezing van het weefsel gaat eveneens het vermogen om glucose te splitsen verloren, in tegenstelling met de glycogeensplitsing. Analoge verschijnselen ziet men met spierextracten, hoewel een weinig verschoven ten gunste van de glucosesplitsing. Men zal dan echter de vraag stellen, hoe is dan de glycogeensplitsing mogelijk. Hierbij wordt toch eveneens glucose gevormd en deze wordt wel verder tot melkzuur omgezet? Men heeft hiervoor een zeer plausibele verklaring gevonden. We kennen een α- en een β-glucose, doch uitsluitend hypothetisch is er nog een derde vorm mogelijk n.l. de γ-glucose. Men neemt aan, dat deze γ-glucose zeer labiel is en buitengewoon gemakkelijk reageert. Verplaatst men zich in dezen gedachtengang, dan is het deze bioglucose, die uit glycogeen gevormd wordt en dadelijk in melkzuur wordt omgezet. Voegt men daarentegen glucose toe, dan moet deze eerst door den thermolabielen factor in γ-glucose worden veranderd, voordat het proces verderen voortgang kan hebben.

Na de hydrolytische splitsing van glycogeen in suiker, zullen we thans de volgende étappe in beschouwing nemen, n.l. de verestering van suiker door phosphorzuur. Reeds H a r d e n en Y o u n g hebben bij de alcoholische suikergisting gevonden, dat daarbij hexose-di-phosphaat optrad, hetwelk in suiker en anorganisch phosphaat zou worden omgezet. Dit gaf hun aanleiding tot de opstelling van hunne bekende theorie: 2 moleculen hexose reageeren met 2 moleculen phosphorzuur, waarbij één molecule hexose in alcohol en kooldioxyde uiteenvalt en het andere gelijktijdig hexose-di-phosphorzuur vormt. Daarna splitst dit laatste zich in phosphorzuur en suiker, waarna het proces opnieuw kan beginnen.

Zij nemen dus aan, dat telkens 2 moleculen hexose ieder afzonderlijk verschillend reageeren. Door E m d e n werd bij de glycogeen-splitsing in spierweefsel eveneens eene verbinding van phosphorzuur met suiker aangetroffen, welke hij lactacidogeen noemde. Later gelukte het hem, de identiteit daarvan met hexose-di-phosphorzuur vast te stellen. (Hiervan is hij later weer teruggekomen.) Het hexose-di-phosphorzuur kwam hier-

door bij deze processen als tusschenproduct in het middelpunt van de belangstelling te staan.

Meyerhof kon met behulp van zijne spierextracten zeer gemakkelijk de phosphorzuur-verestering en de daaropvolgende melkzuur-afsplitsing vervolgen. Voegt men aan het extract polysacchariden toe, dan ziet men gedurende den aanvang, bij geringe melkzuurvorming, de hoeveelheid anorganisch phosphaat afnemen door de verestering met suiker. Daarna neemt zij weer toe door de splitsing van den ester, gepaard gaande met rijkelijke melkzuur-vorming. Van belang was het om na te gaan, op welke wijze toegevoegd hexose-di-phosphaat zich zou gedragen. Met een versch, sterk werkend extract bleek de splitsing van hexose-di-phosphaat in melkzuur in het begin minstens even groot te zijn als van glycogeen, doch zij daalde langzamerhand meer en meer en kwam binnen 2 uren practisch geheel tot stilstand. Werd nu glycogeen of een ander geschikt polysaccharide toegevoegd, dan trad opnieuw aanmerkelijke melkzuurvorming op, welke eerst 4 à 5 uren daarna tot stilstand kwam. Men kan dit verklaren door aan te nemen, dat er intermediair uit de polysacchariden stoffen ontstaan, die beter melkzuur vormen dan hexose-di-phosphorzuur. Tevens bleek, dat het vermogen om uit koolhydraten melkzuur te vormen, verminderde, naarmate het hexose-di-phosphorzuur zich ophoopte. Stuit men de melkzuurvorming geheel door toevoeging van natriumfluoride, dan wordt uitsluitend hexose-di-phosphorzuur gevormd.

Bij de alcoholische gisting geraakte eveneens de opvatting, dat hexose-di-phosphorzuur als tusschenproduct zou fungeeren, in het gedrang, o.a. door het feit, dat hexose-di-phosphaat door levende gistcellen niet en door gistperssap zeer onvolledig in alcohol en koolzuurgas wordt gesplitst.

Meer en meer vatte de meening post, dat de vorming van het hexose-di-phosphorzuur als een ziekelijk verschijnsel van het proces moet worden opgevat. In onbeschadigd spierweefsel, waarbij men met een voortreffelijk werkend systeem te doen heeft, is er dan ook geen sprake van, dat men hexose-di-phosphorzuur kan aantoonen. Het lag daarom meer voor de hand, het hexose-di-phosphaat voor een stabiliseeringsproduct aan te

zien en met andere mogelijkheden ernstig rekening te gaan houden.

Reeds was er door verschillende auteurs op gewezen, dat de mono-hexose-phosphorzure esters meer in het chemisch kader van de omzetting zouden passen. IJverig is men dan ook naar deze gaan zoeken en met succes. Robinson vond er een in gistperssap, Embden een bij de glycogeenomzetting door spierweefsel. Neuberg kreeg er een in handen langs chemischen weg door ontleding van hexose-di-phosphorzuur, welke hij later eveneens in biergist aantrof. Het chemisme van deze esters, waarbij men tengevolge van de isomerie met een groot aantal mogelijkheden rekening heeft te houden, is buitengewoon ingewikkeld. In de eerste plaats is elke ester op zichzelve al een mengsel van isomeren. De Robinson'sche- evenals de Embden'sche ester bestaan uit een dergelijk mengsel, waarin de aldose-component domineert. Bij de Neuberg'sche ester heeft de ketose-component de overhand en bedraagt ongeveer het 4-voudige van den monose-component. Bij het bestudeeren van de omzettingen dezer mono-esters heeft men zeer belangrijk feitenmateriaal in handen gekregen, hetwelk in de richting wijst, dat zij intermediair een rol kunnen spelen. Opvallend is reeds de eigenschap, dat zij in tegenstelling met hexose-diphosphaat bij 37° C. in phosphaatoplossing, spontaan geoxydeerd worden door luchtzuurstof. Hierbij wordt opgemerkt, dat de Neuberg'sche ester met zijn hoog fructose-gehalte nog drie tot vier maal sterker wordt aangegrepen, dan de Robinson'sche ester met laag fructosegehalte. Door spierextract worden zij eveneens met groote snelheid omgezet, gedeeltelijk in melkzuur en voor een ander deel tegelijkertijd in hexose-di-phosphorzuur. Hierbij treedt eveneens de superioriteit van den fructose-mono-ester weer aan den dag. Geconstateerd is, dat de analogie van het snelle omzettingsvermogen dezer mono-esters zich eveneens uitstrekt tot het proces der alcoholische suikergisting. Uit dit alles behoeft nog niet noodzakelijkerwijze voort te vloeien, dat speciaal de genoemde mono-esters intermediair een rol zullen spelen. Het is zelfs waarschijnlijk, dat in status nascens nog beter reageerende, uitsluitend fructose-esters gevormd worden.

Wel moet men nog altijd rekening houden met de omstandig-

heid, dat het mogelijk is, dat intermediair beter splitsbare di-phosphorzure esters gevormd worden en het proces per saldo zoowel over de mono- als de di-phosphorzure esters plaats vindt. Te meer, omdat ook de Harden en Young'sche ester uit een mengsel van isomeren bestaat en zoowel de vorming als de splitsing daarvan over mono-esters loopt.

Thans blijft nog over de bespreking van de laatste étappe van het proces, n.l. de melkzuurafsplitsing uit hexose-phosphorzuur.

Uit het voorgaande is het reeds waarschijnlijk geworden, dat we te doen hebben met een fructose-phosphorzure-ester. Uit den aard der zaak kan het niet dezelfde hexose zijn, die door hydrolytische splitsing uit glycogeen gevormd is. Dan toch zou deze zonder verestering onmiddellijk in melkzuur omgezet worden. Reeds dadelijk valt op te merken, dat het ferment, werkzaam zijnde bij dit gedeelte van het proces, veel stabieler is, dan hetgene waardoor de estervorming tot stand kwam. Dit blijkt reeds daaruit, dat (kikker-)extracten, die slechts 15 minuten bij 37° C. verwarmd of 24 uur in ijs geplaatst zijn, geen melkzuur uit glycogeen meer kunnen vormen, doch wel met bijna onverminderde snelheid uit de phosphorzure-esters. Ook de antiproteolytisch-werkende invloed (coferment) kan in dit stadium bijna ontbeerd worden.

Ziet men bij het gefractioneerd verloopend proces gedurende de estervorming de hoeveelheid anorganisch phosphaat afnemen, deze komt thans bij de melkzuur-vorming weder vrij. Wat de tusschenproducten aangaat, neemt men aan, dat de suiker via het labiele methylglyoxaal-hydraat overgaat in het stabiele melkzuur. Men is op deze gedachte gekomen door de publicaties van de Americanen Dakin en Dudley en den Duitscher Neuberg, die toevalligerwijze gelijktijdig verschenen. Zij vonden, dat methylglyoxaal door dierlijk weefsel buitengewoon snel in melkzuur wordt omgezet. Later werd nog opgemerkt, dat genoemde omzetting eveneens tot stand kwam door melkzuur-bacteriën, bij de azijnzuur- en propionzuurgisting, door de cellen van zaadplanten en zelfs door groene bladeren van Phanerogamen. Ondanks dit groote onderzoekingsmateriaal, hetwelk de biologische beteekenis van het methylglyoxaal en het daarop ingestelde ferment boven

allen twijfel verheft, is het nog niet gelukt, methylglyoxaal als tusschenproduct op afdoende wijze aan te toonen.

Fischler heeft het door zijne onderzoekingen zeer aannemelijk gemaakt, dat bij abnormale koolhydraatafbraak in het organisme zich methylglyoxaal ophoopt. Men is n.l. in staat, bij patiënten, lijdende aan suikerziekte, de gestoorde koolhydraatstofwisseling door inspuiting van insuline in het algemeen weer in normale banen te leiden; grootere hoeveelheden van dit medicament daarentegen kunnen aanleiding geven tot een zeer laag suikergehalte van het bloed en van de weefsels, waarbij o.a. spierkrampen op kunnen treden en tenslotte de dood volgt. Wordt tijdig in een of anderen vorm suiker toegediend, dan verdwijnen deze z.g.n. hypoglycaemische verschijnselen geheel. Fischler toonde nu aan, dat dieren, die in het hypoglycaemisch stadium verkeerden, door inspuiting met methylglyoxaal-oplossing, onmiddellijk stierven. Spoot hij echter meer dan de doodelijke hoeveelheid methylglyoxaal en tegelijkertijd glucose in, dan werd het dier weer geheel normaal.

Ook langs chemischen weg heeft Fischler getracht, methylglyoxaal aan te toonen in door insuline-intoxicatie gestorven dieren. Hij onderwierp daartoe zoowel bloed als spierweefsel-extract, na verwijdering van het eiwit, aan destillatie. Het destillaat werd opgevangen in een met natronloog alcalisch gemaakte jodium-oplossing, daar een methylglyoxaal-bevattend destillaat in staat is, daaruit jodoform af te scheiden, zelfs nog in een concentratie van 1 : 1000000. In overeenstemming met zijne verwachting gelukte dit dan ook. Proeven op de zelfde wijze ingesteld met materiaal van dieren afkomstig, welke niet met insuline behandeld waren, verliepen negatief. Omdat ook andere vluchtige stoffen in staat zijn op dezelfde wijze te reageeren, is het absolute bewijs door hem wel benaderd doch niet geleverd.

Nog op een andere wijze was hij in staat meer kracht aan zijne veronderstelling bij te zetten. Hij merkte n.l. op, dat wanneer dieren door hem werden ingespoten met een toxisch-werkende dosis insuline en daarna in het hypoglycaemisch stadium gedood, het spierweefsel zijne prikkelbaarheid veel langer behield, dan dit bij niet behandelde dieren het geval is.

Bracht hij een afgesneden achterpoot van een insuline-dier in 0,6 % keukenoplossing van 37° C., dan gelukte het hem door slechts even in het weefsel te snijden, daarin sterk uitgesproken trekkingen van vrij langdurigen aard op te wekken. Deze trekkingen waren zoo heftig, dat soms de geheele extremiteit er door in beweging geraakte en zelfs nagelbewegingen werden geconstateerd. In sommige gevallen merkte hij deze verschijnselen nog 40 minuten na den dood op en bleef de uitwerking van één zoo'n prikkeling dan nog tot 10 minuten lang waar te nemen. Herhaalde hij deze proef op de zelfde wijze met een achterpoot van een niet met insuline behandeld dier, dan merkte hij dit niet op, doch spoot hij methylglyoxaal in de poot, dan zag hij eveneens de zelfde trekkingen optreden, zelfs indien de inspuiting 20 minuten na den dood verricht werd. Zeer interessant was zijne waarneming, dat genoemde verschijnselen ook thans uitbleven, indien methylglyoxaal en glucose tegelijkertijd werden ingespoten.

Hiermede is de bespreking van de laatste étappe ten einde. Zooals reeds bij het begin van deze voordracht werd opgemerkt, hebben Meyerhof en Hill aangetoond, dat het glycolytisch proces de energie levert voor de spierfunctie. De vraag zal nu rijzen, wat gebeurt er verder met het tijdens de spiercontractie geproduceerde melkzuur, m.a.w. welke plaats neemt de glycolyse bij de koolhydraat-stofwisseling in? Hieromtrent valt op te merken, dat het melkzuur in den rusttoestand, practisch gesproken, geheel verdwijnt. Men heeft nagegaan, dat de hoeveelheid zuurstof, die door de intermediaire stofwisseling optreedt, in staat is, slechts ongeveer ¼ gedeelte van de voorhanden hoeveelheid melkzuur te verbranden tot kooldioxyde en water. Het overblijvende ¾ gedeelte moet dus noodzakelijkerwijze op een andere manier worden omgezet. Aangezien nu gelijktijdig bij de oxydatie van 't melkzuur weer glycogeen in de spier optreedt, is de meest voor de hand liggende veronderstelling, dat het niet verbrande melkzuur weer gesynthetiseerd wordt. De hiervoor benoodigde energie kan geleverd worden door het gedeelte van het melkzuur, dat oxydatief verdwijnt. Hierdoor is dan de kringloop voltooid.

Niet onvermeld mag blijven, dat deze processen niet alleen onder den invloed van het zenuwstelsel staan, doch ook onder

dien van z.g.n. hormonen, waarvan het insuline een voorbeeld is. Volgens Lesser beinvloedt insuline in spierweefsel zoowel de melkzuuroxydatie als de glycogeen-synthese.

Of nu in alle weefsels en organen de glycolyse, althans in principe op dezelfde wijze plaats heeft als in spierweefsel, kan slechts vermoed worden. Het tegendeel daarvan is tot heden nog niet gebleken. Het feit, dat de omzettingen bij het glycolytisch proces in spierweefsel ons thans, zij het dan ook met enkele haken en oogen, vrij duidelijk zijn, heeft een groote beteekenis voor de klinische scheikunde. Hierdoor heeft men zoo goed als zeker den sleutel in handen gekregen, waarmede het probleem aangaande de suikeromzettingen in andere weefsels, waarover wij thans nog in het onzekere verkeeren, in de toekomst zal worden opgelost.

In bloed neemt men in vitro eveneens glycolyse waar. Men heeft bij de bepaling van het suikergehalte, daarmede terdege rekening te houden. De suikerafname is reeds na één uur goed merkbaar. Het proces in bloed is echter eenigermate verkort, daar het begint met afbraak van glucose. De vraag, of dan in het bloed nimmer glycogeen of althans hoogere suikers voorkomen, mag zeker niet kortweg met neen beantwoord worden. Temeer, daar na Lépine telkens weer publicaties opduiken, waarbij de auteurs opgeven, toenemende reductie van de suikerfractie van het bloed te hebben opgemerkt. Ook betreffende het toenemen van het suikergehalte van de urine, afgeleid uit de vermeerderde draaiing van het polarisatie-vlak, zijn twee gevallen bekend, waarvan er één van Folin. De beteekenis van het voorkomen van suiker in het bloed is echter een geheel andere, dan van suiker in spierweefsel, aangezien het bloed als het transportmiddel daarvan naar de verschillende weefsels wordt beschouwd.

Staan processen, zooals het hier genoemde, in het middelpunt der belangstelling van de physiologen, ook de medicus kan de bestudeering daarvan slecht missen. Hij toch is aangewezen precies op de plaats, waar het mechanisme te kort schiet, zoo mogelijk therapeutisch in te grijpen. Doch ook zij, die dagelijks onderzoekingen in dierlijk materiaal hebben te verrichten, aangaande de werking der fermenten of de daardoor eventueel

veroorzaakte chemische afwijkingen, dienen zich op de hoogte te houden van de vorderingen der wetenschap, bij deze processen gemaakt.

Met nadruk valt er nog op te wijzen, dat voor zooverre we thans in staat zijn de suikeromzettingen in de natuur te beoordeelen, deze zoowel bij planten als dieren, waarbij de microorganismen niet uitgezonderd, in den grond der zaak op hetzelfde principe neerkomen. Steeds blijkt men weer met een aaneengeschakelde keten van fermenten te doen te hebben.